

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

PCT

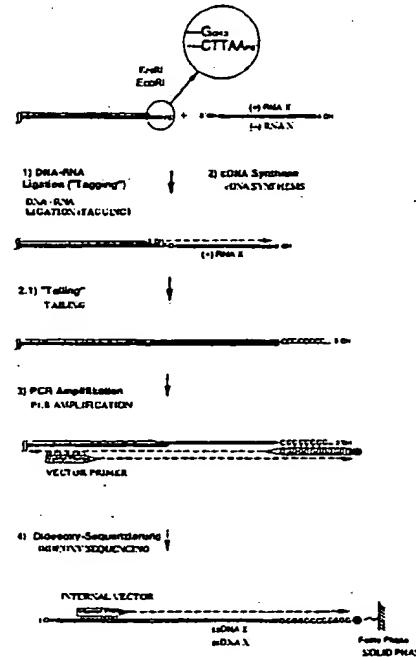
WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 5 : <b>C12N 15/10, C12Q 1/68</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 94/29443</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>22. December 1994 (22.12.94)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP94/01869</b>		(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>8. Juni 1994 (08.06.94)</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen</i>	
(30) Prioritätsdaten: <b>P 43 19 468.0 11. Juni 1993 (11.06.93) DE</b>			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>MÜLLER, Manfred, W. [AT/AT]; Cobenzlgasse 59, A-1190 Wien (AT).</b>			
(74) Anwalt: <b>GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR &amp; PARTNER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).</b>			
<p><i>Abdruck ONLY</i></p> <p>(54) Title: ANALYSIS OF RNA SEQUENCES BY PCR (54) Bezeichnung: ANALYSE VON RNA SEQUENZEN MITTELS PCR (57) Abstract</p> <p>The invention pertains to a method for producing a DNA strand complementary to an RNA molecule, that is a cDNA strand. Past methods for producing a cDNA strand equivalent to the full length of the corresponding RNA molecule were carried out starting from primers which hybridize at the poly A tail of the RNA molecule. Poly A'RNA could not, therefore, be transcribed in this way. In the method as per the invention the 3'-hydroxyl end of an RNA molecule is covalently linked with the 5'-phosphate end of any first DNA strand, and the cDNA strand, starting from the 3'-hydroxyl end of a second DNA strand or oligonucleotide complementary to the DNA strand linked with the RNA molecule, is synthesized by means of reverse transcriptase. The process as per the invention is used for analysis of RNA molecules.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verfahren zum Herstellen eines zu einem RNA-Molekül komplementären DNA-Stranges (cDNA-Stranges). Die bisherigen Verfahren zum Herstellen eines cDNA-Stranges, der der vollständigen Länge des entsprechenden RNA-Moleküls entspricht, wurden ausgehend von Primern durchgeführt, die an den poly(A)-Schwanz des RNA-Moleküls hybridisieren. Poly A'RNA konnte daher auf diese Weise nicht umgeschrieben werden. In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das 3'-Hydroxyl-Ende eines RNA-Moleküls mit dem 5'-Phosphat-Ende eines beliebigen, ersten DNA-Stranges kovalent verknüpft und der cDNA-Strang ausgehend von dem 3'-Hydroxyl-Ende eines zweiten DNA-Stranges oder Oligonukleotids, welches zu dem mit dem RNA-Molekül verknüpften DNA-Strang komplementär ist mittels reverser Transkriptase synthetisiert. Das erfindungsgemäße Verfahren wird zur Analyse von RNA-Molekülen verwendet.</p>			



**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolai	VN	Vietnam

-1-

### ANALYSE VON RNA SEQUENZEN MITTELS PCR.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen eines zu einem Ribonukleinsäure(RNA)-Molekül komplementären Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Stranges (cDNA-Stranges), sowie die Verwendung des Verfahrens zur Analyse von RNA-Molekülen.

Mangels geeigneter Verfahren wird eine direkte Analyse von RNA-Molekülen in modernen Gentechnik-Labors kaum noch durchgeführt. Das Arbeiten mit RNA erfordert zudem besondere, zeitaufwendige Vorkehrungen, um die RNA vor einem Abbau durch Ribonukleasen zu schützen. Heutzutage wird deshalb RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in komplementäre DNA (cDNA) übersetzt. cDNA ist die Bezeichnung für die einzel- bzw. doppelsträngige DNA-Kopie eines RNA-Moleküls. Die vorstehend erwähnte RNA-abhängige DNA-Polymerase wird auch als "Reverse Transkriptase" bezeichnet. Sie verwendet Desoxyribonukleosid-Triphosphate als Substrate und benutzt die RNA als Matrize für die Synthese des DNA-Stranges.

Für die Synthese des ersten cDNA-Stranges sind verschiedene Verfahren entwickelt worden. Diese Verfahren basieren auf der Verwendung von kurzen Oligonukleotiden, die komplementär zu einem Teilbereich eines RNA-Moleküls sind. Durch Hybridisierung des Oligonukleotids an die RNA entsteht ein kurzer, doppelsträngiger Nukleinsäurebereich, der von der Reversen Transkriptase als Primer (Starter) für die Synthese des ersten DNA-Stranges benötigt wird. Als Primer wird beispielsweise Oligo(dT) verwendet, das an den poly(A)-Schwanz von bestimmten mRNA-Molekülen ( $\text{poly}(A)^+$ -RNA) hybridisieren kann. Soll nichtpolyadenyierte RNA, wie z.B. ribosomale RNA, in DNA umgeschrieben werden, so kann nachträglich mit poly(A)-Polymerase ein poly(A)-Schwanz an das 3'-Ende der RNA ansynthetisiert werden. Dieser kann dann wiederum mit Oligo(dT)

-2-

eine doppelsträngige Startregion ausbilden.

Weiterhin können als Primer Mischungen kurzer DNA-Hexanukleotide aller theoretisch denkbaren Sequenzabfolgen verwendet werden. Bei diesem als "Random-Priming" bezeichneten Verfahren werden einige dieser Hexanukleotide an RNA hybridisieren und als Starter für die cDNA-Synthese fungieren können. Ein Nachteil ist jedoch, daß meist der Anteil vollständig kopierte RNA-Moleküle sinkt.

Falls ein Teil der Sequenz eines zu untersuchenden RNA-Moleküls bekannt ist, kann ein spezifisches Oligonukleotid, das zu der bekannten Sequenz komplementär ist, als Primer eingesetzt werden.

Für die Synthese des zweiten DNA-Stranges gibt es ebenfalls mehrere Strategien. Beim sogenannten "Selbst-Priming" wird nach der Synthese des ersten cDNA-Stranges der RNA-Anteil aus dem gebildeten DNA/RNA-Hybrid durch Behandlung mit Alkali oder durch Hitzedenaturierung entfernt. Man nutzt nun die Tatsache aus, daß die gebildete, einzelsträngige cDNA am 3'-Ende, also demjenigen Ende, das dem 5'-Ende der kopierten RNA entspricht, vorübergehend sogenannte Haarnadelstrukturen ausbildet. Diese kurzen doppelsträngigen Bereiche können wiederum von der DNA-Polymerase als Primer für die Synthese des zweiten DNA-Stranges verwendet werden. Der Haarnadelbereich wird durch die nachfolgende Synthese stabilisiert, so daß einseitig kovalent geschlossene, doppelsträngige cDNA-Moleküle entstehen. Durch vorsichtige Behandlung mit Desoxyribonukleasen, wie z.B. S1-Nuklease oder Mung bean-Nuclease können diese Moleküle geöffnet werden. Es besteht jedoch immer die Gefahr, daß man Sequenzen vom 5'-Ende der RNA verliert.

Eine weitere Technik geht von einzelsträngiger cDNA aus, an deren 3'-Ende mit terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase ein homopolymerer Oligo(dC)-Schwanz angelagert wird. Der für

-3-

die Synthese des zweiten cDNA-Stranges benötigte, doppelsträngige Primerbereich entsteht durch Reaktion des am ersten cDNA-Strang vorhandenen Oligo(dC)-Schwanzes mit einem komplementären Oligo(dG)-Primer.

Beim Gubler-Hoffman-Verfahren handelt es sich um "RNA-Priming". Hierbei verzichtet man auf die Entfernung des RNA-Stranges aus dem nach der Synthese des ersten cDNA-Stranges gebildeten RNA/DNA-Hybridmolekül. Unter kontrollierten Bedingungen wird der RNA-Strang im intakten Hybridmolekül mit einer spezifischen Ribonuklease (RNase H) behandelt, so daß kurze RNA-Primer mit freiem Hydroxyl-Ende an der einzelsträngigen cDNA verbleiben. Diese dienen dann in einer gleichzeitig laufenden Reaktion als Primer für die Synthese des zweiten DNA-Stranges durch DNA-Polymerase.

Obwohl es möglich ist, die nach der Synthese des ersten cDNA-Stranges entstandenen RNA/DNA-Hybridmoleküle direkt zu klonieren, wird meist mit doppelsträngiger cDNA gearbeitet. Diese kann in weiteren Experimenten in einen geeigneten Klonierungsvektor eingebaut werden. Da die cDNA-Moleküle, bedingt durch die Syntheseschritte, meist undefinierte Enden aufweisen, müssen sie nach der Synthese mit Enden versehen werden, die den gezielten Einbau in einen Klonierungsvektor erlauben. Für diesen Zweck verwendet man homopolymere Nukleotidschwänze oder doppelsträngige als "Linker" bezeichnete Oligonukleotide, die die Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease tragen. Zum Anhängen der Linker werden die Enden der cDNA enzymatisch so bearbeitet, daß glatte DNA-Enden entstehen.

Verschiedene Techniken der cDNA-Synthese kombinieren die einzelnen Syntheseschritte und die nachfolgenden Klonierungsreaktionen. Beispielsweise werden beim Heidecker-Messing-Verfahren an ein Vektormolekül angebrachte Oligo(dT)-Schwänze zur Anlagerung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA und zum Primen der cDNA-Synthese verwendet. Eine relativ aufwendige Abfolge von Reak-

tionen führt nach der Synthese des ersten cDNA-Stranges zur Klonierung einer doppelsträngigen cDNA.

Es ist weiterhin bekannt, cDNA-Stränge mittels geeigneter Primer durch die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) zu amplifizieren. Als Primer kommen Oligonukleotide in Frage, die entweder an den cDNA-Strang direkt hybridisieren oder an einen an den cDNA-Strang angelagerten homopolymeren Nukleotid-Schwanz oder Linker. Die amplifizierten cDNA-Fragmente können danach in einen Vektor kloniert oder auch direkt sequenziert werden.

Für die DNA-Sequenzierung, d.h. die Bestimmung der Abfolge von Basen in einem DNA-Molekül, werden heute meist zwei methodisch unterschiedliche Verfahren angewendet: die Maxam-Gilbert-Technik, auch als chemische DNA-Sequenzierung bezeichnet, und das Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger, auch enzymatische DNA-Sequenzierung oder die Didesoxy-Sequenzierung genannt.

Von der Sequenz der cDNA kann man direkt auf die ursprüngliche RNA-Sequenz schließen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Verfahren zum Herstellen eines zu einem RNA-Molekül komplementären DNA-Stranges zur Verfügung zu stellen, welches im Vergleich zu bekannten Verfahren erhöhte Ausbeuten an cDNA-Molekülen liefert.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 17 gelöst.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet den großen Vorteil, daß es ausgehend von subnanomolaren Konzentrationen von sowohl polyadenylierten als auch nicht-polyadenylierten RNA-Molekülen durchführbar ist, und auf diese Weise indirekt RNA-Mole-

küle sehr effizient analysiert werden können.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17 zur Analyse von RNA-Molekülen.

Die Erfindung wird nachstehend mit Bezug auf die Zeichnungen im einzelnen erläutert.

Die Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens:

- 1) Verknüpfung des 5'-Phosphat-Endes (P5') eines doppelsträngigen DNA-Moleküls mit 5'- überhängendem Ende mit dem 3'-Hydroxyl-Ende (3'OH) eines RNA-Moleküls ((+)RNA X),
- 2) cDNA-Synthese ausgehend vom 3'-Hydroxyl-Ende des DNA-Moleküls,
- 3) PCR-Amplifikation der cDNA mittels eines ersten Primers, der an den 3'-5'-Strang des DNA-Moleküls hybridisiert (Vektor-Primer), und eines zweiten, biotinylierten Primers, der an den ersten cDNA-Strang hybridisiert (-Primer), und
- 4) Festphasen-Didesoxy-Sequenzierung des zweiten cDNA-Stranges mittels Streptavidin-beschichteter magnetischer Kugelchen.

Die Figur 2 stellt schematisch die Schritte der Figur 1 dar, mit dem Unterschied, daß nach der Synthese des ersten cDNA-Stranges an diesen ein homopolymerer Nukleotid-Schwanz angefügt wird (2.1) und der zweite biotinylierte Primer an diesen homopolymeren Nukleotid-Schwanz hybridisiert.

In die Stufe (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens nach Anspruch 1 können sowohl einzel- als auch doppelsträngige

DNA-Moleküle mit einem 5'-Phosphat-Ende eingesetzt werden.

Vorzugsweise wird jedoch in Stufe (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens nach Anspruch 1 ein zumindest teilweise doppelsträngiges DNA-Molekül eingesetzt. Besonders bevorzugt ist ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit einem 5'-überhängenden Ende. Das 5'-überhängende Ende kann durch Spalten des DNA-Moleküls mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease, wie z.B. EcoRI, erzeugt werden.

Vorzugsweise verwendet man einen gängigen, kommerziell erhältlichen DNA-Vektor, der mit einer geeigneten Restriktions-endonuklease linearisiert wird.

Die Verknüpfung des 5'-Phosphat-Endes des DNA-Stranges mit dem 3'-Hydroxyl-Ende des einzelsträngigen RNA-Moleküls ("tagging") wird vorzugsweise enzymatisch mittels einer Ligase durchgeführt.

Als Ligase eignet sich eine RNA-Ligase, wie z.B. T4-RNA-Ligase, die in Gegenwart von  $Mn^{2+}$  DNA- und RNA-Moleküle kovalent miteinander verbindet.

Falls ein einzelsträngiges DNA-Molekül in Stufe (a) eingesetzt wird, wird vorzugsweise nach dem Verknüpfen des DNA-Stranges mit dem einzelsträngigen RNA-Molekül ein Oligonukleotid als Primer für die cDNA-Synthese verwendet, das an den DNA-Strang hybridisiert. Für die Auswahl eines geeigneten Oligonukleotids ist es wünschenswert, die Sequenz des eingesetzten einzelsträngigen DNA-Moleküls zumindest teilweise zu kennen.

Bei Verwendung eines doppelsträngigen DNA-Moleküls fungiert das 3'-Hydroxyl-Ende des nicht mit dem RNA-Molekül verknüpften DNA-Stranges direkt als Primer für die cDNA-Synthese.

Die cDNA-Synthese wird enzymatisch mittels Reverser Transkriptase, welche kommerziell erhältlich ist, durchgeführt.

Der so erhaltene erste cDNA-Strang kann nachfolgend durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Dabei werden zwei Fälle unterschieden:

- (i) eine Teilsequenz aus dem zu analysierenden RNA-Molekül ist bereits bekannt, und
- (ii) das RNA-Molekül, welches analysiert werden soll, ist völlig unbekannt, d.h. es steht keine Sequenzinformation zur Verfügung.

Im ersten Fall kann man für die PCR einen ersten Primer verwenden, dessen Sequenz komplementär zu einer Teilsequenz des mit dem RNA-Molekül verknüpften DNA-Stranges ist (plus-Strang-Primer) und einen zweiten Primer, der komplementär zu dem ersten cDNA-Strang ist (minus-Strang-Primer), d.h. dessen Sequenz einer Teilsequenz des RNA-Moleküls entspricht.

Im zweiten Fall, d.h. wenn keine Sequenzinformation bezüglich des zu analysierenden RNA-Moleküls zur Verfügung steht, wird nach der Synthese des ersten cDNA-Stranges an dessen 3'-Ende ein Oligonukleotid angefügt ("tailing"). Vorzugsweise werden mittels terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) homopolymere, einzelsträngige Nukleotid-Schwänze ansynthetisiert. Das Enzym katalysiert die Anlagerung von Desoxynukleosid-Triphosphaten an die 3'-Enden eines DNA-Fragments, ohne hierfür eine Matrize zu benötigen. An dem vorliegenden DNA-RNA/cDNA-Hybridmolekül verläuft die Reaktion effizienter an glatten Enden als an Enden, an denen aufgrund einer nur partiellen reversen Transkription das 5'-Hydroxyl-Ende des RNA-Moleküls noch übersteht. Diese Tatsache begünstigt die Selektion auf cDNA, die der vollen Länge

des zu analysierenden RNA-Moleküls entspricht. Alternativ können unter Verwendung von T4-DNA-Ligase Oligonukleotide, wie z.B. Linker, an den synthetisierten ersten cDNA-Strang angefügt werden. Dieses Enzym akzeptiert ebenfalls DNA/RNA-Hybridmoleküle als Substrat. Als Linker bezeichnet man chemisch synthetisierte, kurzkettige Oligonukleotide von 6 bis 12 Basen Länge, die die Erkennungssequenz für eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen enthalten. Als minus-Strang-Primer können somit Oligonukleotide verwendet werden, die komplementär zu dem an den cDNA-Strang angefügten homopolymeren Nukleotid-Schwanz bzw. zu dem angefügten Linker sind.

Die PCR wird in an sich bekannter Weise durchgeführt, z.B. mittels Taq-DNA-Polymerase.

Die durch PCR amplifizierten cDNA-Moleküle können anschließend sequenziert oder kloniert werden.

Falls die cDNA sequenziert werden soll, ist es bevorzugt, in die PCR einen am 5'-Ende biotinylierten minus-Strang-Primer einzusetzen. Dies erlaubt eine schnelle Isolierung der an diesen Primer ansynthetisierten cDNA-Moleküle aus der Reaktionsmischung mit Hilfe von Streptavidin-beschichteten magnetischen Kugelchen (magnetic beads). Die isolierten, einzelsträngigen cDNA-Moleküle können anschließend unter Verwendung eines geeigneten Sequenzierungs-Primers (plus-Strang-Primer) z.B. durch die Didesoxy-Kettenabbruch-Methode mittels T7-DNA-Polymerase sequenziert werden. Obwohl diese direkte Festphasensequenzierung bevorzugt ist, können alle bekannten Sequenzierungsverfahren verwendet werden. Aus der Sequenz des cDNA-Moleküls kann man direkt auf die Sequenz des zu analysierenden RNA-Moleküls schließen.

Wenn die durch die PCR amplifizierte cDNA kloniert werden soll, ist es bevorzugt, sowohl als plus-Strang-Primer als

auch als minus-Strang-Primer biotinylierte Oligonukleotide zu verwenden, die die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease enthalten. Die amplifizierten cDNA-Moleküle können dann mit Hilfe von mit Streptavidin-beschichteten magnetischen Kugelchen aus der Reaktionsmischung gereinigt werden. Die an die magnetischen Kugelchen über den Streptavidin/Biotin-Komplex gebundenen cDNA-Moleküle können anschließend mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease, die für die in den Primern enthaltene Erkennungssequenz spezifisch ist, freigesetzt werden. Dieses Verfahren erlaubt eine Selektion auf cDNA-Moleküle, die an beiden Enden von der verwendeten Restriktionsendonuklease geschnitten sind, wodurch die Klonierungsausbeute erhöht wird.

Für die in der PCR amplifizierten cDNA-Moleküle können weitere bekannte Klonierungssysteme verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es, RNA-Moleküle zu analysieren. Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorzugsweise für die in vitro-Diagnostik von genetischen Defekten verwendet werden. Dazu werden dem Patienten beispielsweise Blutzellen entnommen, aus denen anschließend die zelluläre RNA isoliert wird. Nach Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens können beispielsweise Erkenntnisse erhalten werden, ob und in welchem Ausmaß ein bestimmtes Gen translatiert wird. Weiterhin können Spleiß-Defekte in RNA-Molekülen sowie post-transkriptionale RNA-Modifikationen (z.B. die Insertion oder Deletion von Nukleotiden (RNA-Editing) nach Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erkannt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren erleichtert somit die genetische Diagnostik.

Außerdem ist das erfindungsgemäße Verfahren bestens dazu geeignet, cDNA-Banken zu erstellen. Dazu können kommerziell erhältliche Klonierungsvektoren verwendet werden, die passende Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen besitzen. Nach

Linearisieren des Vektors durch Schneiden mittels einer Restriktionsendonuklease kann an den überhängenden 5'-Phosphat-Enden die erfindungsgemäße cDNA-Synthese durchgeführt werden. Nach wahlweiser Modifikation des 3'OH-Endes der erzeugten cDNA und Ausnutzen weiterer Restriktionsendonukleaseschnittstellen im Vektor können Vektor plus cDNA religiert werden. Dieses Verfahren führt zu hohen Ausbeuten an cDNA-Klonen und kann sowohl ausgehend von poly(A)<sup>+</sup>- als auch von poly(A)<sup>-</sup>-RNA durchgeführt werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiel 1

(1) Tagging: Gel-gereinigte einzelsträngige RNA (0,1 bis 10 pMol) wurde über Nacht bei 4°C mit 0,1 pMol eines mit EcoRI gespaltenen Plasmids (BS/bII; Augustin, S., Müller, M.W., Schweyen, R.J. (1990) Nature 343, 383-385)) im Vorhandensein von 5 Einheiten T4-RNA-Ligase (Pharmacia) in 20 µl Endvolumen unter den folgenden Reaktionsbedingungen inkubiert: 50 mM HEPES (pH 8,0), 3 mM DTT, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) und 0,1 mM ATP.

(2) Direkte Initiierung der cDNA-Synthese: 2 µl der Reaktionsmischung wurden direkt in die cDNA-Synthesereaktion eingesetzt, die für 15 min bei 40°C unter Verwendung von 10 Einheiten SuperScript Reverse Transcriptase (RT; Gibco BRL) in 20 µl durchgeführt wurde: 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 40 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 0,3 mM dNTPs.

(3) PCR-Amplifizierung der cDNA: 2,5 µl der cDNA-Synthesereaktionsmischung wurden direkt in eine Standard-PCR eingesetzt (1' 94°C, 30'' 58°C, 1' 72°C; 35 Zyklen), die in 50 µl Reaktionsvolumen unter Verwendung von 1 Einheit Taq-DNA-Polymerase (Stratagene) und unter den vom Hersteller (Stratagene) beschriebenen Pufferbedingungen durchgeführt wurde. Amplifi-

zierte PCR-Produkte: 424 bp bis 428 bp. Verwendete PCR-Primer: BS/bII-spezifischer plus-Strang-Primer (5' GATTAATGTGAAAGCATGCTAACTTC; 25 pMol); 5'-terminal biotinylierter Primer (5' AAATCTGGTACCGGGAACAAAGGAAGAC; 25 pMol), partiell komplementär (unterstrichen) zum 3'-Teil der cDNA-Sequenz.

(4) Direkte Festphasen-Sequenzierung der PCR-Produkte: Die Reinigung der PCR-Produkte und die Didesoxy-Sequenzierung unter Verwendung von magnetischen Kugelchen als Festphase wurden durchgeführt wie beschrieben in Holtman, S., Staahl, E., Hornes, M., Uhlen, L., (1989) Nucl. Acids Res. 17, 4937-4939. Verwendeter Sequenzierungs-Primer: GAATATCTTATATTAATT-AAGAGTATAG; plus-Strang BS/bII.

#### Beispiel 2

(1): Tagging und (2) direkte Initiierung der cDNA-Synthese: wie in Beispiel 1.

(2.1) Tailing: 2,5  $\mu$ l der cDNA-Synthesereaktionsmischung wurden für das Tailing mit einem homopolymeren dCTP-Schwanz in 20  $\mu$ l Endvolumen im Vorhandensein von 10 Einheiten terminaler Transferase (Boehringer, Mannheim) unter den vom Hersteller (Boehringer; Mannheim) beschriebenen Bedingungen eingesetzt.

(3) PCR-Amplifizierung der verlängerten cDNA-Produkte: 2,5  $\mu$ l der Tagging-Reaktionsmischung wurden direkt in eine Standard-PCR (1' 94°C, 30'' 58°C, 1' 72°C; 35 Zyklen) eingesetzt, die in einem 50  $\mu$ l Reaktionsvolumen unter Verwendung von 1 Einheit Taq-DNA-Polymerase (Stratagene) und unter den vom Hersteller (Stratagene) beschriebenen Pufferbedingungen durchgeführt wurde. Verwendete PCR-Primer: BS/bII spezifischer plus-Strang-Primer (5' GATTAATGTGAAAGCATGCTAACTTC; 25 pMol); 5'-terminal biotinylierter Primer (5' GGGGGGGGGGGGGGG; 25 pMol),

-12-

komplementär oder teilweise komplementär zum 3'-terminalen  
 $dC_{(n)}$ -Schwanz der cDNA-Sequenz.

(4) Direkte Festphasen-Sequenzierung der PCR-Produkte:  
wie in Beispiel 1.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines zu einem RNA-Molekül komplementären DNA-Stranges (cDNA-Stranges), gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
  - a) Verknüpfen des 5'-Phosphat-Endes eines beliebigen, ersten DNA-Stranges mit dem 3'-Hydroxyl-Ende eines RNA-Moleküls und
  - b) Synthetisieren des cDNA-Stranges, ausgehend von dem 3'-Hydroxyl-Ende eines zweiten DNA-Stranges oder Oligonukleotids, welcher(s) zu dem mit dem RNA-Molekül verknüpften DNA-Strang komplementär ist, mittels Reverser Transkriptase.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Stufe a) ein zumindest teilweise doppelsträngiges DNA-Molekül eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein doppelsträngiges DNA-Molekül, dessen 5'-Phosphat-Ende ein 5'-überhängendes Ende ist, eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das 5'-überhängende Ende durch Spalten des DNA-Moleküls mittels einer Restriktionsendonuklease erzeugt worden ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als DNA-Molekül ein Plasmid eingesetzt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Verknüpfen in Stufe a) mittels einer Ligase durchgeführt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Ligase RNA-Ligase eingesetzt wird.

- 14 -

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das 3'-Ende des cDNA-Stranges verlängert wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid an ein doppelsträngiges cDNA/RNA-Hybrid mit glattem Ende angefügt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Verlängerung terminale Desoxynukleotidyl-Transferase eingesetzt wird und homopolymere Nukleotid-Schwänze angefügt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Verlängerung DNA-Ligase eingesetzt wird und Linker angefügt werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der cDNA-Strang durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein erster Primer eingesetzt wird, dessen Sequenz komplementär zu einer Teilsequenz des mit dem RNA-Molekül verknüpften DNA-Stranges ist, und ein zweiter Primer eingesetzt wird, der komplementär zu dem erzeugten cDNA-Strang oder komplementär zu dem an den cDNA-Strang angefügten Oligonukleotid oder homopolymeren Nukleotid-Schwanz ist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das amplifizierte cDNA-Molekül anschließend sequenziert wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß in die PCR als zweiter Primer ein biotinylierter Primer eingesetzt wird, und die an diesen Primer synthetisierten cDNA-Stränge vor der Sequenzierung mittels Streptavidin-beschichteter magnetischer Kugelchen gereinigt werden.

- 15 -

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das amplifizierte cDNA-Molekül kloniert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß (i) in die PCR als erster und zweiter Primer biotinylierte Primer eingesetzt werden, die die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease umfassen, (ii) die amplifizierten cDNA-Moleküle mittels Streptavidin-beschichteter magnetischer Kugelchen gereinigt werden, (iii) die an die magnetischen Kugelchen gebundenen cDNA-Moleküle einer Restriktionsendonuklease ausgesetzt werden, die für die in den Primern enthaltene Erkennungssequenz spezifisch ist und (iv) die von den magnetischen Kugelchen freigesetzten cDNA-Moleküle kloniert werden.

18. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17 zur Analyse von RNA-Molekülen.

19. Verwendung nach Anspruch 18 zur in vitro-Diagnostik von genetischen Defekten, pathogenen RNA-Viren sowie zur Erzeugung von cDNA-Banken.

1/2

Figure 1

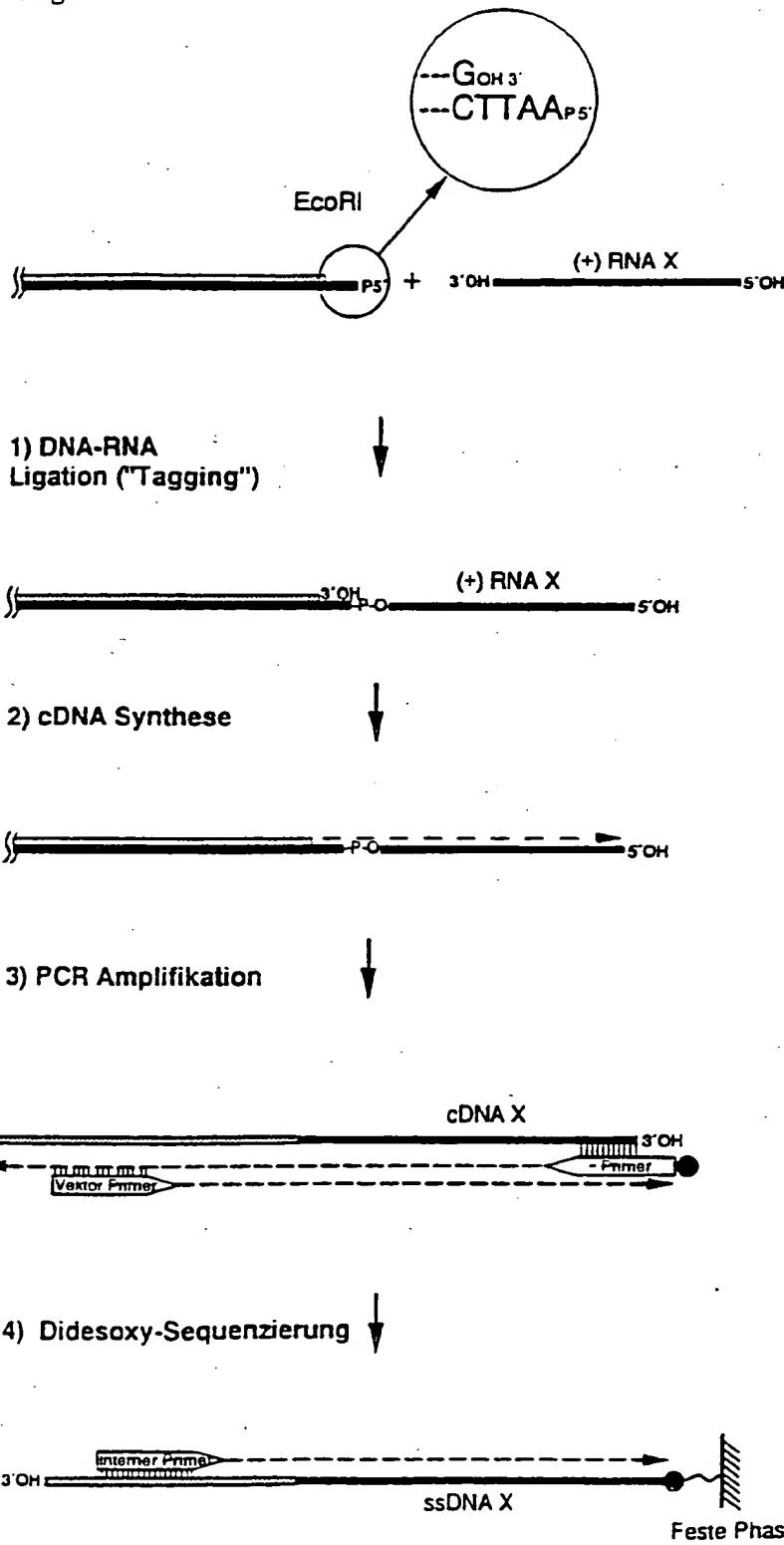
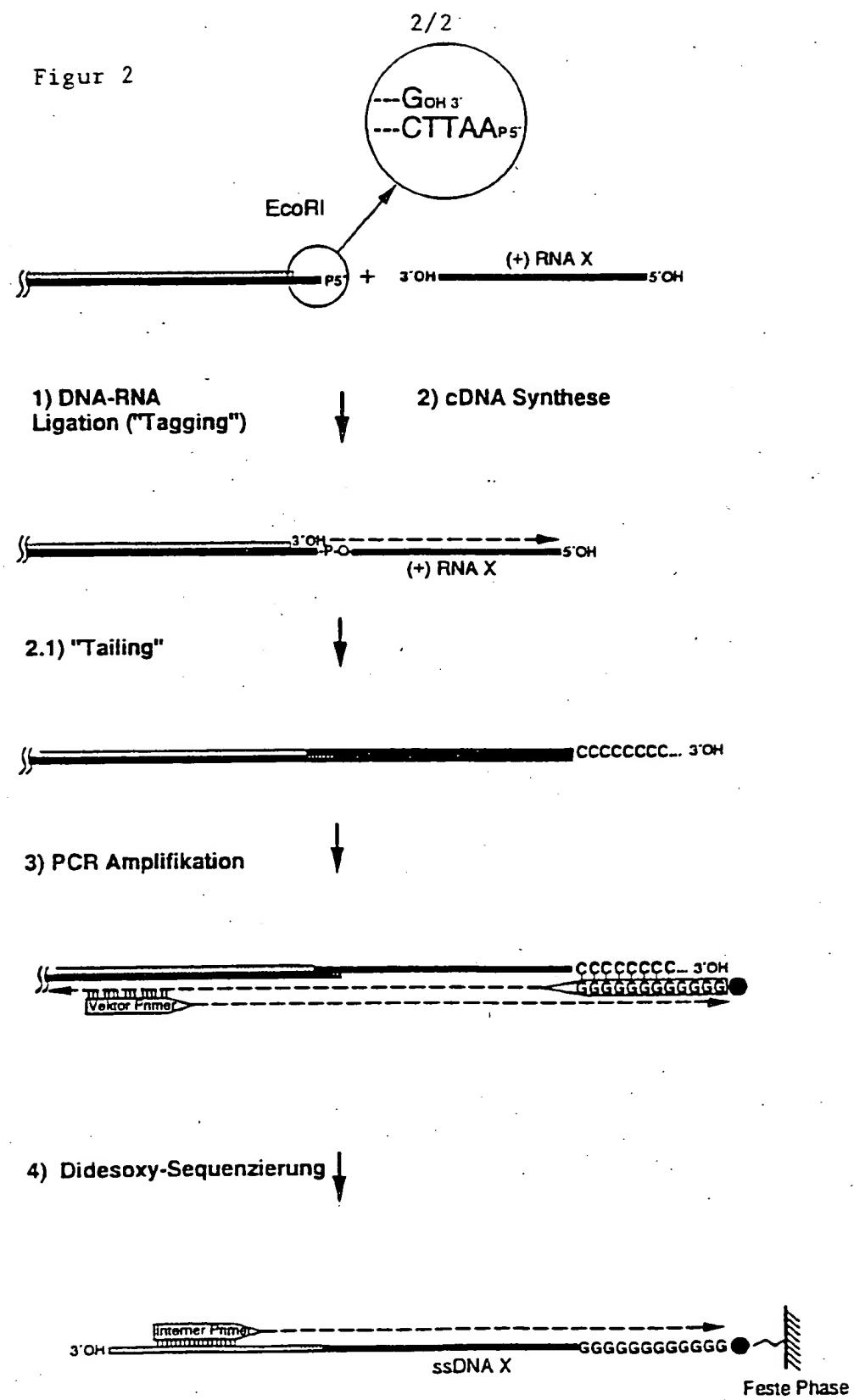


Figure 2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/01869

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 5 C12N15/10 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 5 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	METHODS IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol.2, 1991, JOHN WILEY & SONS PUBL., NEW YORK, US; pages 273 - 279 A. WEXLER ET AL. 'A procedure to amplify cDNA from dsRNA templates using the polymerase chain reaction' see page 273, left column, line 1 - page 278, left column, line 6; figure 1 ---	1,6-8,12
Y	FR,A,2 678 639 (RHONE-POULENC RORER (S.A.)) 8 January 1993 see page 7, line 12 - page 12, line 9 ---	2-5, 9-11, 13-19
Y	FR,A,2 678 639 (RHONE-POULENC RORER (S.A.)) 8 January 1993 see page 7, line 12 - page 12, line 9 ---	2-5, 9-11, 13-19
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- 'Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 September 1994

Date of mailing of the international search report

19.10.94

## Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+ 31-70) 340-3016

## Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 94/01869

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NUCL. ACIDS RES., vol.21, no.3, 11 February 1993, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 761 - 762 P. PALITTAPONGARNPIM ET AL. 'DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis isolates by ligation-mediated polymerase chain reaction' see page 761, left column, line 1 - page 762, left column, line 30; figure 1 ---	2-5, 9-11, 13-19
Y	NUCL. ACIDS RES., vol.18, no.10, 25 May 1990, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 3095 - 3096 A. ROSENTHAL AND D.S.C. JONES 'Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction' see page 3095, left column, line 1 - page 3096, left column, line 3; figure 1A ---	2-5, 9-11, 13-19
Y	WO,A,90 01064 (GENELABS INCORPORATED) 8 February 1990 see page 6, line 3 - page 21, line 17; claims 1-10; figures 1-4 ---	2-5, 9-11, 13-19
Y	NUCL. ACIDS RES., vol.19, no.19, 11 October 1991, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 5227 - 5232 J.B.D.M. EDWARDS ET AL. 'Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification' see page 5228, left column, line 1 - page 5229, left column, line 14; figure 2 ---	2-5, 9-11, 13-19
Y	WO,A,93 08305 (DYNAL AS) 29 April 1993 see page 1, line 1 - page 9, line 25; figure 1 ---	14-18
Y	NUCL. ACIDS RES., vol.17, no.13, 11 July 1989, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 4937 - 4946 T. HULTMAN ET AL. 'Direct solid phase sequencing of the genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support' cited in the application the whole document ---	14-18

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 94/01869

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>SCIENCE, vol. 261, 20 August 1993, AAAS, WASHINGTON, DC, US; pages 1035 - 1038 M.W. MUELLER ET AL. 'Group II intron RNA catalysis of progressive nucleotide insertion: A model for RNA editing' see page 1038, middle column, line 4 - line 31 ----</p>	1-19
P, X	<p>NUCL. ACIDS RES., vol. 21, no. 23, 25 November 1993, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 5526 - 5527 M. HETZER AND W. MUELLER 'PCR mediated analysis of RNA sequences' see page 5526, left column, line 1 - page 5527, left column, line 13 -----</p>	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No  
PCT/EP 94/01869

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR-A-2678639	08-01-93	NONE		
WO-A-9001064	08-02-90	AU-A-	3974989	19-02-90
WO-A-9308305	29-04-93	AU-A-	2787692	21-05-93

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 94/01869

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 5 C12N15/10 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol)

IPK 5 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	METHODS IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd.2, 1991, JOHN WILEY & SONS PUBL., NEW YORK, US; Seiten 273 - 279 A. WEXLER ET AL. 'A procedure to amplify cDNA from dsRNA templates using the polymerase chain reaction' Y siehe Seite 273, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 278, linke Spalte, Zeile 6; Abbildung 1 ---	1,6-8,12
Y	FR,A,2 678 639 (RHONE-POULENC RORER (S.A.)) 8. Januar 1993 siehe Seite 7, Zeile 12 - Seite 12, Zeile 9 ---	2-5, 9-11, 13-19
Y	---	2-5, 9-11, 13-19

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

\* Sonstige Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie zugeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'&amp;' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

30. September 1994

19.10.94

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter ~~valer~~ Aktenzeichen  
PCT/EP 94/01869

## C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Ber. Anspruch Nr.
Y	NUCL. ACIDS RES., Bd.21, Nr.3, 11. Februar 1993, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; Seiten 761 - 762 P. PALITTAPONGARNPIM ET AL. 'DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis isolates by ligation-mediated polymerase chain reaction' siehe Seite 761, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 762, linke Spalte, Zeile 30; Abbildung 1 ---	2-5, 9-11, 13-19
Y	NUCL. ACIDS RES., Bd.18, Nr.10, 25. Mai 1990, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; Seiten 3095 - 3096 A. ROSENTHAL AND D.S.C. JONES 'Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction' siehe Seite 3095, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 3096, linke Spalte, Zeile 3; Abbildung 1A ---	2-5, 9-11, 13-19
Y	WO,A,90 01064 (GENELABS INCORPORATED) 8. Februar 1990  siehe Seite 6, Zeile 3 - Seite 21, Zeile 17; Ansprüche 1-10; Abbildungen 1-4 ---	2-5, 9-11, 13-19
Y	NUCL. ACIDS RES., Bd.19, Nr.19, 11. Oktober 1991, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; Seiten 5227 - 5232 J.B.D.M. EDWARDS ET AL. 'Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification' siehe Seite 5228, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 5229, linke Spalte, Zeile 14; Abbildung 2 ---	2-5, 9-11, 13-19
Y	WO,A,93 08305 (DYNAL AS) 29. April 1993 siehe Seite 1, Zeile 1 - Seite 9, Zeile 25; Abbildung 1 ---	14-18 -/-

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern  
als Aktenzeichen  
PCT/EP 94/01869

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	NUCL. ACIDS RES., Bd.17, Nr.13, 11. Juli 1989, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; Seiten 4937 - 4946 T. HULTMAN ET AL. 'Direct solid phase sequencing of the genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support' in der Anmeldung erwähnt the whole document ---	14-18
P,X	SCIENCE, Bd.261, 20. August 1993, AAAS, WASHINGTON, DC, US; Seiten 1035 - 1038 M.W. MUELLER ET AL. 'Group II intron RNA catalysis of progressive nucleotide insertion: A model for RNA editing' siehe Seite 1038, mittlere Spalte, Zeile 4 - Zeile 31 ---	1-19
P,X	NUCL. ACIDS RES., Bd.21, Nr.23, 25. November 1993, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; Seiten 5526 - 5527 M. HETZER AND W. MUELLER 'PCR mediated analysis of RNA sequences' siehe Seite 5526, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 5527, linke Spalte, Zeile 13 ----	1-19

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen  
PCT/EP 94/01869

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
FR-A-2678639	08-01-93	KEINE		
WO-A-9001064	08-02-90	AU-A-	3974989	19-02-90
WO-A-9308305	29-04-93	AU-A-	2787692	21-05-93